

Huberth Alexandre da Rocha Júnior

**Influência da Oxigenação Hiperbárica nas
propriedades mecânicas e estruturais da matriz
óssea em ratos diabéticos**

Dissertação apresentada à
Faculdade de Odontologia da
Universidade Federal de Uberlândia, para
obtenção do Título de Mestre em
Odontologia na Área de Clínica
Odontológica Integrada

UBERLÂNDIA, 2016

Huberth Alexandre da Rocha Júnior

Influência da Oxigenação Hiperbárica nas propriedades mecânicas e estruturais da matriz óssea em ratos diabéticos

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia, para obtenção do Título de Mestre em Odontologia na Área de Reparo Tecidual e Biomecânica.

Orientadora: Profa. Dra. Paula Dechichi

Co-orientadora: Profa. Dra. Priscilla Barbosa Ferreira Soares

Banca examinadora: Profa. Dra. Paula Dechichi

Prof. Dr. Antonio Wilson de Almeida

Profa. Dra. Ana Paula Coelho Balbi

UBERLÂNDIA, 2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

R672i Rocha Júnior, Huberth Alexandre da, 1991
2016 Influência da oxigenação hiperbárica nas propriedades mecânicas e
estruturais da matriz óssea em ratos diabéticos / Huberth Alexandre da
Rocha Júnior. - 2016.
21 f. : il.

Orientadora: Paula Dechichi.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Odontologia.
Inclui bibliografia.

1. Odontologia - Teses. 2. Diabetes - Teses. 3. Ossos - Teses. 4.
Biomecânica - Teses. I. Dechichi, Paula. II. Universidade Federal de
Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. III. Título.

CDU: 616.314



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA



Ata da defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO junto ao Programa de Pós-graduação em Odontologia, Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia.

Defesa de: Dissertação de Mestrado Acadêmico nº 288 – COPOD

Data: 17/02/2016

Discente: Huberth Alexandre da Rocha Júnior, Matrícula: 11412ODO007

Título do Trabalho: Influência da Oxigenação Hiperbárica nas propriedades mecânicas e estruturais da matriz óssea em ratos diabéticos.

Área de concentração: Clínica Odontológica Integrada.

Linha de pesquisa: Biomecânica aplicada à Odontologia.

Projeto de Pesquisa de vinculação: Biomecânica aplicada à Odontologia.

As **quinze** horas do dia **dezessete de fevereiro do ano de 2016** no Anfiteatro Bloco 4L, Anexo A, Sala 23, Campus Umuarama da Universidade Federal de Uberlândia, reuniu-se a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em janeiro 2016, assim composta: Professores Doutores: Ana Paula Coelho Balbi (UFU); Antônio Wilson de Almeida (IMEPAC); e Paula Dechichi (UFU) orientador(a) do(a) candidato(a) **Huberth Alexandre da Rocha Júnior**.

Iniciando os trabalhos o(a) presidente da mesa Dra. Paula Dechichi apresentou a Comissão Examinadora e o candidato(a), agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de argüição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor (a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos (às) examinadore (a)s, que passaram a argüir o (a) candidato (a). Ultimada a argüição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu os conceitos finais.

Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou o (a) candidato(a) A provado(a).

Esta defesa de Dissertação de Mestrado Acadêmico é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre. O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos às 17 horas e 55 minutos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.

Profa. Dra. Ana Paula Coelho Balbi – UFU

Prof. Dr. Antônio Wilson de Almeida – IMEPAC

Profa. Dra. Paula Dechichi – UFU
Orientador (a)



Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Uberlândia, MG. Av. Pará s/n, Bloco 4LB, Sala 4L B35, Fone:(34) 3225 8115, www.pgo.fo.ufu.br, copod@umuarama.ufu.br.

SUMÁRIO

RESUMO	6
ABSTRACT	7
1 INTRODUÇÃO E REFERENCIAL TEÓRICO	8
2 PROPOSIÇÃO	13
3 MATERIAL E MÉTODOS	13
4 RESULTADOS	24
5 DISCUSSÃO	27
6 CONCLUSÃO	32
REFERÊNCIAS	33
ANEXOS	40

RESUMO

Este estudo avaliou as propriedades mecânicas do osso e características estruturais no fêmur de ratos diabéticos submetidos à oxigenação hiperbárica (OH). Vinte e quatro ratos foram divididos em quatro grupos ($n=6$): Controle (GC); Controle + OH (CH); Diabetes (GD) e Diabetes + OH (DH). As sessões de terapia por OH foram realizadas a cada 48 horas e começaram 30 dias após a indução com estreptozotocina. O sacrifício de todos os animais ocorreu 60 dias após a indução do diabetes mellitus (DM). Teste de flexão a três pontos e espectroscopia no infravermelho transformada de Fourier (FTIR) foram realizados para obtenção das propriedades mecânicas (força máxima, rigidez e energia) e estruturais (razão das ligações cruzadas em amida I (AI), índice de cristalinidade (IC) e proporção entre colágeno e mineral (M:MI e M:MIII)). Foi aplicado o teste ANOVA TWO-WAY seguido do teste de Tukey, sendo a diferença estatística considerada quando $\alpha < 0,05$. Na análise mecânica GD e DH apresentaram menores valores de força, rigidez e energia comparados aos animais sadios GC e CH ($p<0,007$). Porém houve aumento na força e rigidez nos grupos com OH (CH e DH) comparando-os com GC e GD ($p<0,042$). As análises do FTIR mostraram que em GD houve redução de ligações cruzadas maduras comparando-o com os outros grupos (GC, CH e DH) ($p=0,003$). Os valores de IC reduziram em GD e DH quando comparados com GC e CH ($p=0,034$). A razão colágeno/mineral em M:MI não apresentou diferença estatística entre os animais dos grupos GC, CH, GD e DH ($p>0,278$). Em M:MIII houve aumento da proporção colágeno/mineral em DH comparado com GC e GD ($p=0,035$). Os resultados sugerem que o DM altera a arquitetura estrutural da hidroxiapatita e colágeno, caracterizada pela redução na capacidade em absorver energia, na força máxima à fratura, na rigidez e no aumento do risco de fratura. Além disso, a OH mostrou ser um importante tratamento ao melhorar propriedades no osso de ratos diabéticos.

Palavras-chave: Diabetes Mellitus, tecido ósseo, oxigenação hiperbárica

ABSTRACT

The present study evaluate the bone mechanical properties and structural characteristics in femur of diabetic rats submitted to hyperbaric oxygen therapy (HBO). Twenty-four rats were divided into groups, as follows: Control (CG); Control + HBO (CH); Diabetes (DG) and Diabetes + HBO (DH). The HBO was performed each 48h and started 30 days after streptozotocin diabetic induction. All animals were euthanized 60 days after diabetic induction. The mechanical properties, crosslink ratio (AI), crystallinity index (CI) and two mineral:matrix ratio (M:MI and M:MIII) were quantified in the femurs. ANOVA TWO-WAY and Tukey test were applied, statistical differences were considered when $\alpha < 0,05$. In mechanical analysis, DG and DH showed lower values of strength, stiffness and energy than healthy animals CG and CH ($P<0.007$). However, there were increase strength and stiffness in HBO groups (CH and DH) compared with CG and DG ($P<0.042$). Fourier Transform Infrared Spectroscopy analyses showed that in DG there was decrease of mature crosslinks compared another groups (CG, CH and DH) ($P=0.003$). The CI values was reduced in DG and DH, compared with CG and CH ($P=0.034$). Mineral:matrix ratio the M:MI showed no statistical difference between CG, CH, DG and DH ($P>0.278$). In M:MIII there was increase of matrix mineral ratio in DH compared to CG and DG ($P=0.035$). The results suggest that the diabetic change the architecture of hydroxyapatite and collagen, characterized by reduction in the capacity to absorb energy, strength, stiffness and increase risk of fracture. However, HBO showed that important treatment to improved bone properties in diabetic rats.

Keywords: Diabetes Mellitus, bone tissue, hyperbaric oxygen

1 INTRODUÇÃO E REFERENCIAL TEÓRICO

Diabetes mellitus (DM) corresponde ao grupo heterogêneo de doenças caracterizadas pelo quadro de hiperglicemia decorrente de alterações na secreção e/ou na ação da insulina. Ao longo das últimas três décadas, a incidência global de DM cresceu de 30 milhões em 1985, para 382 milhões em 2014 (Wild, 2004; Leon & Maddox, 2015). As últimas estimativas da Federação Internacional de Diabetes indicam que 592 milhões de indivíduos - 1 em cada 10 pessoas - no mundo terão DM em 2035 (Aguirre et al., 2013; Leon & Maddox, 2015).

As complicações tardias do DM afetam principalmente vasos sanguíneos, nervos, rins e olhos. A patogênese dessas complicações é complexa e envolve acometimento macro e microvascular, decorrentes do quadro de hiperglicemia. O DM provoca diversas alterações pancreáticas, aterosclerose e suas consequências como infarto do miocárdio e acidente vascular cerebral, arterioesclerose hialina, glomerulopatia e nefropatia, miocardiopatia, neuropatia e alterações oculares que incluem retinopatia, catarata e glaucoma (Riella, 2002; ADA, 2004).

Estudos clínicos também têm associado os efeitos do DM nos ossos, indicando osteopenia, redução da densidade óssea, atraso na consolidação das fraturas e aumento no tempo de reparo ósseo em pacientes diabéticos quando comparados com pacientes normoglicêmicos (Reddy et al., 2001; Vestergaard et al., 2005; Saller et al., 2008). Estudos com ratos e camundongos com DM verificaram redução da densidade óssea e do conteúdo mineral, além de diminuição dos níveis séricos de osteocalcina e da resistência biomecânica (Reddy et al., 2001).

Existem evidências que pacientes com DM têm maior risco à fratura em relação a indivíduos saudáveis, mesmo apresentando níveis normais de densidade mineral óssea (DMO), o que indica que este aumento em fragilidade óssea de diabéticos não estaria restrito apenas à DMO destes pacientes, mas

principalmente a uma redução em qualidade óssea e consequente diminuição de resistência (Vestergaard, 2007; Janghorbani et al., 2007).

O osso é um órgão do corpo humano extremamente complexo, considerado o principal reservatório de íons do organismo, como cálcio, fosfato e sódio, ele ainda armazena a medula óssea em seu interior. Além disso, está relacionado à regulação do metabolismo energético e exerce funções mecânicas a partir do envolvimento com os músculos e movimento corporal (Dempster, 2006; Wei & Ducy, 2010). Os elementos estruturais dos ossos são organizados de forma hierárquica desde o menor ao maior nível da escala de comprimento (Felsenberg & Boonen, 2005). No menor nível da escala a estrutura óssea possui basicamente componentes orgânicos e inorgânicos, os quais conferem aos ossos características como flexibilidade e rigidez (Dempster, 2006). A matriz orgânica é composta por uma matriz extracelular flexível e resistente constituída por proteoglicanos, proteínas não colagenosas e, principalmente colágeno tipo I, molécula formada por três cadeias polipeptídicas organizadas em tripla hélice (Dempster, 2006).

Enquanto isso, no interior desta matriz encontram-se os componentes rígidos ou minerais ósseos, como cálcio e fosfato, na forma de hidroxiapatita (Dempster, 2006). As moléculas de colágeno formam uma rede de moléculas praticamente equidistantes entre si a cada 67 nm de distância (Bailey, 2001). Neste espaço ocorre a deposição de cristais entre as moléculas de colágeno e na superfície das mesmas (Dechichi et al., 2007). A união entre estes componentes orgânicos e inorgânicos tem como resultado uma rede de fibrilas colágenas mineralizadas (Currey, 2006).

Estudos com espectroscopia no infravermelho transformada (FTIR) que visam caracterizar estruturalmente o osso por meio da absorbância da energia vibracional das moléculas que compõem a matriz óssea têm demonstrado que os grupos de amida dos polipeptídios e proteínas possuem um número de modos vibracionais ou grupo de frequências característico (Changa & Tanaka, 2002). Dessa forma, principalmente a amida primária (I), secundária (II) e terciária (III), presentes no espetro ósseo, têm sido

diretamente ligadas à conformação estrutural polipeptídica da molécula de colágeno, compreendendo as ligações cruzadas entre as moléculas de colágeno e a interação entre estas moléculas e os nano cristais de hidroxiapatita (Changa & Tanaka, 2002).

Ligações cruzadas enzimáticas entre as moléculas de colágeno equidistantes têm papel fundamental na estabilidade da rede colagenosa (Rho et al., 1998; Barth et al., 2011). Inicialmente, as ligações imaturas conectam as moléculas maduras que interligam as fibrilas colágenas. Por outro lado, ligações cruzadas não enzimáticas, como os produtos finais de glicosilação avançada (AGEs) decorrentes do quadro de hiperglicemia, associados às moléculas de colágeno, podem estabelecer conexões intra e interfibrilar fracas, aumentando a fragilidade óssea (Bailey, 2001).

A natureza hierárquica da estrutura dos ossos é a base para o entendimento de suas propriedades mecânicas, como resistência e tenacidade à fratura. Assim, a integridade mecânica está intimamente ligada a mecanismos intrínsecos e extrínsecos de tenacidade dos ossos (Ritchie, 1999).

Os mecanismos intrínsecos originam-se da nano escala hierárquica de comprimento e referem-se à influência da estrutura do osso e das deformações à frente da ponta de uma trinca provocada. Estes mecanismos visam proteger a integridade óssea principalmente a partir da geração de plasticidade (Ritchie, 1999). Quando o osso se encontra sob deformação elástica as fibrilas colágenas mineralizadas tendem a alongar-se, de forma que características nano estruturais, como as ligações cruzadas de colágeno, auxiliam neste alongamento que contribui para deformação das fibrilas (Silver et al., 2000; Siegmund et al., 2008). Por outro lado, os cristais contribuem com aumento na rigidez das fibrilas (Nair et al., 2013). Outra característica importante quanto aos mecanismos intrínsecos equivale ao deslizamento interfibrilar, o qual confere a plasticidade ao osso devido ao fato de estudos mostrarem que durante a deformação elástica do osso a deformação das fibrilas também aumenta proporcionalmente, sendo que durante a deformação plástica a deformação fibrilar tende a ser constante mesmo com a deformação

dos outros componentes da amostra (Barth et al., 2011; Zimmermann et al., 2013). Alterações na matriz colágena, especialmente nas ligações cruzadas entre as fibrilas colágenas teriam papel crucial neste mecanismo deslizante (Zimmermann et al., 2013). A presença de proteínas não colagenosas ou fibrilas colágenas entre as estruturas hierárquicas da escala de comprimento, sejam elas moléculas de colágeno, fibrilas, fibras ou lamelas, formariam uma espécie de cola que facilitaria também a deformação plástica (Nalla et al., 2003).

Resistência à propagação de trinca também ocorre porque o crescimento desta trinca ativa os mecanismos extrínsecos, os quais localmente visam proteger a trinca da força aplicada. Os mecanismos extrínsecos originam-se da microescala hierárquica de comprimento, na qual a presença dos componentes dos ósteons interagem ao longo das trincas. A capacidade do tecido de formar micro trincas à frente da trinca principal, por exemplo, reduz o campo de tensão à frente da trinca principal e aumenta o raio de propagação da mesma, de forma que é necessário aumento da tensão na frente da trinca principal para indução de formação de novas trincas (Dooley et al., 2012). A formação de pontes entre trincas, deflexão ou torção das trincas como consequência à trinca principal induz a mudança de direção da trinca principal e mudança no plano de propagação, ocasionando em proteção extra e aumento da resistência mecânica do osso. A linha cimentante é o caminho de menor resistência para a propagação da trinca. Dessa forma, quando a trinca chega a esta região mais mineralizada, ela se propaga gerando superfícies mais planas, porém quando a trinca se propaga transversalmente no canal de Harvers, a superfície se torna mais irregular, alterando o sentido e a forma de propagação dessa trinca (Nalla et al., 2003;).

Possível redução da enzima lisil oxidase no meio extracelular aumentaria o número de moléculas de colágeno com as terminações Lis ou Hidroxilisina livres, possibilitando a formação de ligações cruzadas não enzimáticas irreversíveis por meio de glicosilação ou oxidação (Seeman & Delmas, 2006). A glicosilação destas terminações possibilita a formação das

AGEs, que em grande quantidade podem propiciar fibrilas colágenas mais friáveis, com consequente acúmulo de micro danos e posterior deterioração de tenacidade e resistência (Saito et al., 2008).

Para avaliar processos de reparo e alterações fisiológicas e patológicas do tecido ósseo, olhares atentos aos componentes biológicos e mecânicos são imperativos. O ensaio de flexão tem sido empregado para obtenção da força máxima resistida pelo tecido, do trabalho necessário para gerar o dano e ainda a rigidez relativa frente à fratura (van Lenthe et al., 2008). Outra ferramenta importante para avaliar os componentes moleculares e biológicos de determinada amostra é a Espectroscopia de Infravermelho (FTIR) (Boskey et al., 2005; Barth et al., 2011). Fica claro no estágio de evolução da ciência que o uso de metodologias não destrutivas, como ensaios mecânicos e caracterização material, podem melhor responder a importantes e relevantes questões pertinentes à pesquisa científica voltada à saúde.

Algumas terapias têm sido utilizadas a fim de reduzir os efeitos do DM no corpo humano, como a terapia medicamentosa, a laserterapia e a oxigenação hiperbárica (OH) (Beckmann et al., 2014; Saraiya & Martin, 2015). A OH tem acelerado a reparação de feridas e reduzido as taxas de amputação em diabéticos (Bishop & Mudge, 2012; Löndahl, 2013). Estudos demonstraram que a OH aumenta os níveis de BMP-2, sialoproteína óssea (BSP), osteocalcina (OC) e IL-10, diminui os níveis de IL-1 e IL-6, reduz a resposta inflamatória, acelera a osteogênese, além de acelerar o processo de remodelação óssea em fraturas (Kawada et al., 2013; Al Hadi et al., 2015) e em defeitos críticos (Jan et al., 2009). Pesquisadores também têm relatado a influência da OH na aceleração da síntese de colágeno estruturalmente organizado com consequente regeneração óssea em lesões ou úlceras (Gurdol et al., 2010; Al Hadi et al., 2015; Sammarco et al., 2015).

2 PROPOSIÇÃO

O objetivo do presente estudo foi avaliar as propriedades mecânicas e as características estruturais da hidroxiapatita e matriz colágena em fêmur de ratos diabéticos, submetidos à terapia de OH. A hipótese do estudo foi que a OH melhoraria as propriedades mecânicas e estruturais da matriz óssea em ratos diabéticos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Delineamento Experimental

Neste estudo, foram utilizados 24 ratos machos (*Rattus norvegicus*), da linhagem Wistar, clinicamente saudáveis com peso entre 240 e 280g. Os animais foram mantidos no depositário de animais da área de Ciências Fisiológicas (ARFIS) do Instituto de Ciências Biomédicas (ICBIM) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) em estantes climatizadas a temperatura de 22°C e ciclo claro-escuro de 12 horas, com ração e água *ad libitum*. Os animais foram aleatoriamente separados em quatro grupos (n=6): Controle (GC); Controle + OH (CH); Diabetes (GD) e Diabetes + OH (DH). A OH iniciou 30 dias após a indução do diabetes sendo realizada a cada 48 horas durante 30 dias. O sacrifício dos animais ocorreu 60 dias após a indução do diabetes (Figura 1).

Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), com aprovação prévia do CEUA-UFU (Protocolo 026/14).

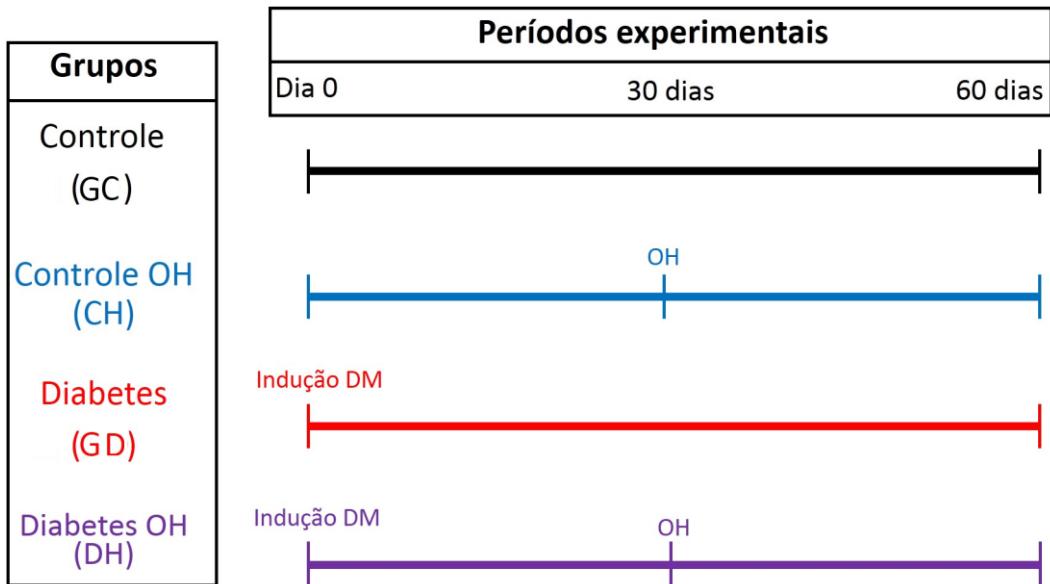


Figura 1: Distribuição dos animais nos grupos de acordo com o tratamento. Grupos: GC – Controle, CH – Controle + OH, GD – Diabetes, DH – Diabetes + OH. Dia 0: Indução do DM; 30 dias: Início da terapia com OH; 60 dias: eutanásia.

3.2 Indução de Diabetes Mellitus (DM)

A indução do DM nos animais dos grupos GD e DH foi realizada com administração endovenosa de estreptozotocina (STZ) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) na dosagem de 65mg/kg de peso corporal diluída em tampão citrato 0,01M. Esta droga produz efeito tóxico sobre as células pancreáticas, induzindo modelo de Diabetes mellitus tipo 1 (Delfino et al., 2002).

Previamente à indução, os ratos foram mantidos em jejum absoluto durante 24h. Após este período, foi realizada anestesia intraperitoneal utilizando 0,07ml/100g do relaxante muscular cloridrato de xilazina 2% (Cristália®, São Paulo, SP, Brazil) e 0,1ml/100g do anestésico e analgésico cloridrato de quetamina 10% (Cristália®, São Paulo, SP, Brazil). Em seguida, a STZ foi administrada por via endovenosa por punção da veia peniana, na dosagem de 65 mg/kg de peso corporal, diluída em tampão citrato 0,01M. Posteriormente, os animais ficaram mantidos em caixas com maravalha em estantes climatizadas, com ração e água *ad libitum*.

A glicemia foi aferida 24 horas, 7, 15 e 30 dias após a indução para confirmação do DM coletando-se uma gota de sangue da cauda dos animais, utilizando glicosímetro Accu Check Active (Roche Diagnóstico Brasil Ltda., São Paulo, SP, Brasil). Os ratos que apresentaram glicemia maior que 200mg/dL foram considerados diabéticos.

Durante a primeira semana após a indução, os animais diabéticos receberam a aplicação subcutânea de 1U de insulina R (Humulin® R, Lilly, Fegersheim, France) e 1U de insulina NPH (Humulin® N, Lilly, Fegersheim, France). Após esse período, os ratos receberam dosagens subcutâneas diárias de 1U de insulina NPH (Humulin® N, Lilly; Fegersheim, France) até o final do experimento.

3.3 Oxigenação Hiperbárica (OH)

Após 30 dias da indução do DM foram iniciadas as sessões de oxigenação hiperbárica nos grupos CH e DH. Os animais receberam 15 sessões de OH, a cada 48 horas, no interior de câmaras “multiplaces” experimentais Ecobar 400 (Ecotec Equipamentos e Sistemas Ltda®, Mogi das Cruzes, SP, Brasil). Para cada sessão foram colocados 5 animais na câmara. Inicialmente, ocorria um período de compressão 0.3 ATA/min (ATA = 1 atmosfera absoluta = 760mmHg) até atingir a pressão necessária para OH. Cada sessão teve duração de 90 minutos sob pressão de 2,5 ATA. Após este período, ocorria descompressão a 0.3 ATA/min e os animais eram removidos das câmaras.

3.4 Obtenção dos espécimes

Os animais foram submetidos à eutanásia, 60 dias após a indução do diabetes, por meio de aprofundamento anestésico e deslocamento cervical, seguindo os princípios da Declaração dos Direitos dos Animais. Em seguida os dois fêmures foram removidos por desarticulação e imediatamente

acondicionados em gaze estéril embebida em PBS 0,1M e congelados em freezer (-20ºC), até o momento da realização do teste mecânico.

3.5 Teste Mecânico

Para realização do teste mecânico, os fêmures foram removidos do freezer 24 horas antes e colocados em tubos falcon de 50 ml contendo PBS 0,1 M na geladeira, depois mais 4 horas em temperatura ambiente antes de começar o teste. Cada fêmur foi submetido a ensaio mecânico de flexão em três pontos até a falha, usando máquina de ensaios de materiais (EMIC DL 2000, EMIC Equipamentos e Sistemas de Ensaio Ltda, São José dos Pinhais, Brasil). Cada fêmur foi posicionado horizontalmente sobre dois apoios do dispositivo da máquina a uma distância de 16mm, sendo a cabeça do fêmur voltada para o lado esquerdo e a face patelar para o direito. A ponta aplicadora de carga (acoplada à célula de carga EMIC com capacidade de 50kgf) foi posicionada no centro do fêmur e foi aplicada carga na direção vertical e no sentido anteroposterior do fêmur a uma taxa de carregamento constante de 1,0 mm / min até o momento de ruptura do osso (Figura 2).

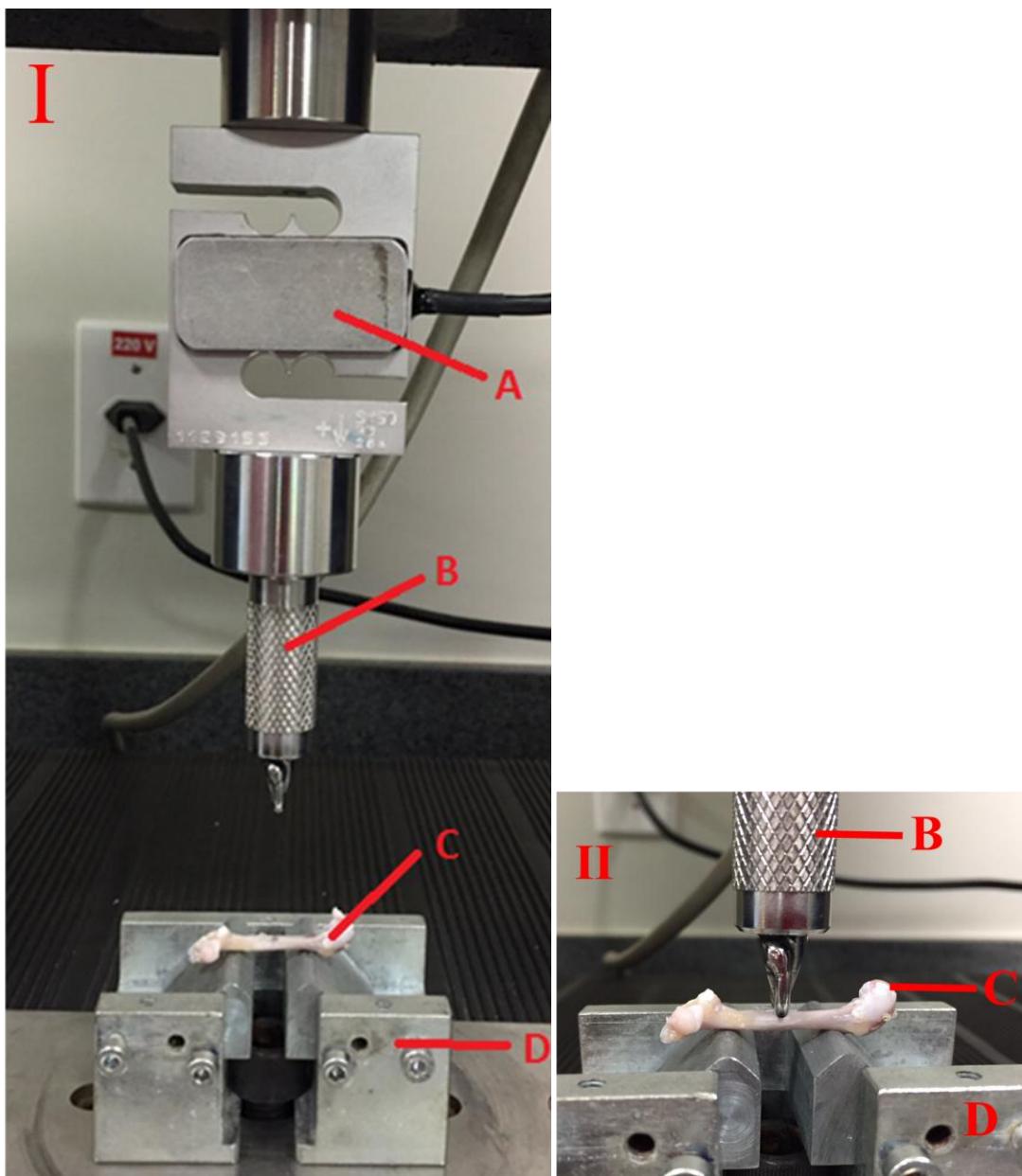


Figura 2: Posicionamento do fêmur na máquina de ensaio mecânico para realização do ensaio de flexão a três pontos. I – Imagem geral: Célula de carga (50kgf) (A); ponta aplicadora de carga (B); fêmur posicionado (C); suporte com dispositivo de assentamento da amostra (D). II – Imagem ampliada do conjunto representado em B, C e D.

Cada incremento de carga aplicada ao fêmur registrou sua deformação correspondente, os quais originaram o gráfico carga x deformação

(Figura 3). A partir dos dados provenientes do gráfico obteve-se as propriedades mecânicas, como força máxima (F_{max} ; N), rigidez (S ; N/mm) e energia absorvida (mJ).

A força máxima (N) é utilizada como critério de avaliação de resistência e equivale ao maior valor de carga com sua deformação correspondente observada em cada ensaio. A rigidez (N/mm) é obtida pelo cálculo da inclinação da curva carga x deformação na região linear do gráfico. A energia absorvida (mJ) é a capacidade do material absorver energia quando deformado elasticamente e readquirir a forma inicial quando a carga que provocou a deformação é removida. O cálculo desta energia absorvida equivale à área abaixo da curva carga x deformação na região elástica, delimitada pelo triângulo OAB da figura (Figura 3).

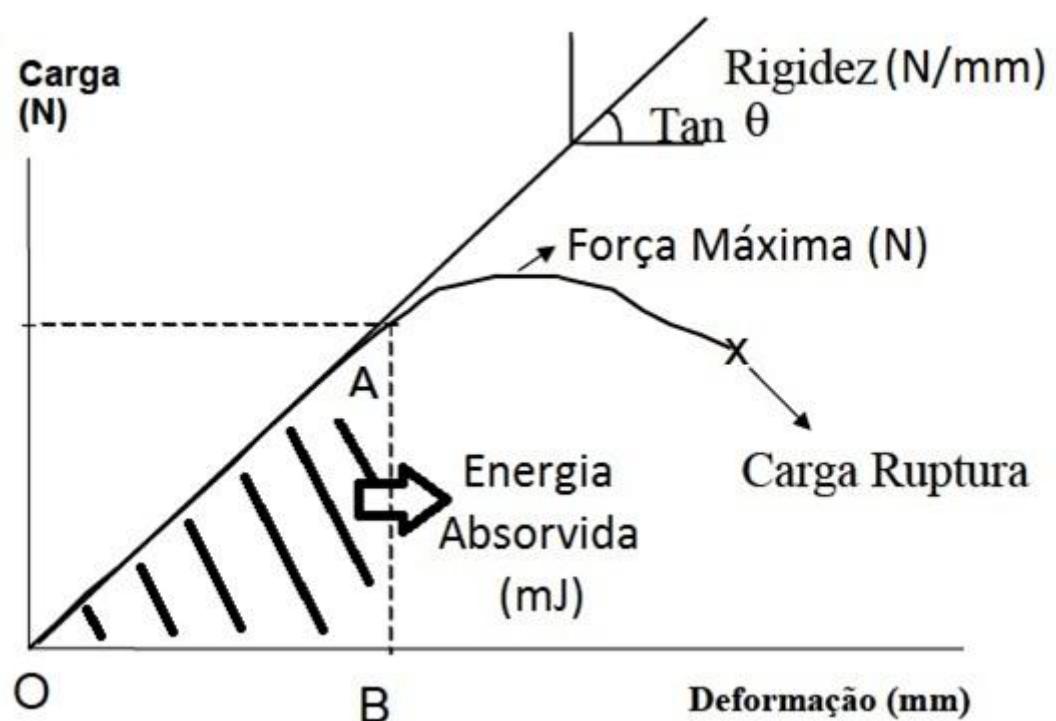


Figura 3: Gráfico carga x deformação utilizado para determinação das propriedades mecânicas, ilustrando a força máxima, a rigidez a partir do cálculo da inclinação da curva AO- ($\text{Tan } \theta$) e a área da região elástica AOB que corresponde à energia absorvida pelo material na fase elástica.

3.6 Espectroscopia no infravermelho transformada de Fourier (FTIR)

Após o ensaio de flexão a três pontos obteve-se dois segmentos do fêmur, resultantes da fratura. Esses foram analisados por espectroscopia no infravermelho transformada de Fourier, utilizando o espectrômetro FTIR Vertex 70 (Bruker, Ettlingen, Germany), com a técnica de reflexão total atenuada (ATR). A espectroscopia consiste na interação entre ondas eletromagnéticas do equipamento e átomos de determinada amostra com posterior absorbância pelo espectrômetro da energia proveniente das vibrações atômicas específicas de cada composto molecular da amostra (Sala, 2008).

Parte da diáfise remanescente, foi seccionada utilizando disco de diamante com irrigação constante para obter os segmentos ósseos. Foram realizados cortes longitudinal e transversal à diáfise, de modo a obter um segmento de 12mm^2 da cortical. Esses foram divididos em 3, obtendo-se 3 segmentos de 4mm^2 . Previamente às análises do FTIR, as amostras foram colocadas em água deionizada por 20 minutos e posteriormente foram mantidas em dessecador por 24 horas (Figuras 4 e 5).

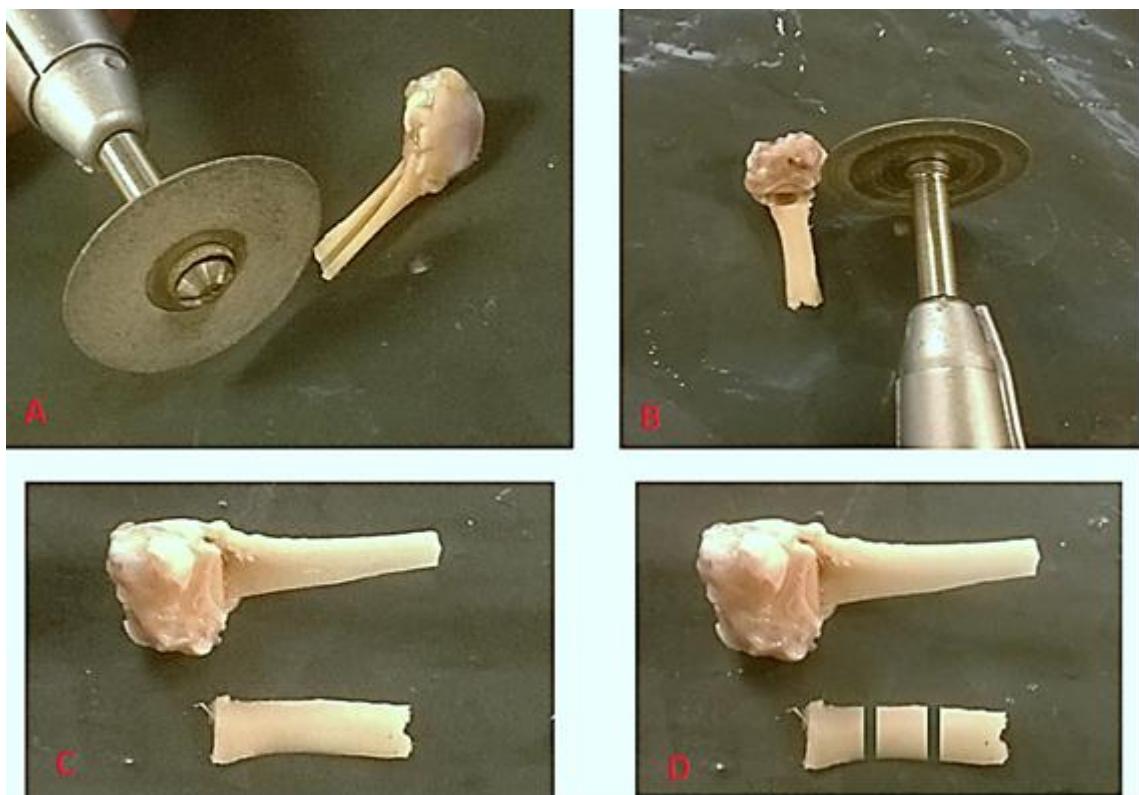


Figura 4: Obtenção dos segmentos da cortical do fêmur para realização do FTIR. Cortes longitudinal (A) e transversal à diáfise, de modo a obter um segmento de 12mm^2 da cortical (C). Esses foram divididos em 3, obtendo-se 3 segmentos de 4mm^2 (D).



Figura 5: Segmento da cortical óssea sendo analisado por espectroscopia no FTIR Vertex 70.

Os parâmetros de análise espectroscópica foram: Intervalo de Aquisição: 400 - 4000 cm⁻¹; Intervalo de dados 2 cm⁻¹; Velocidade de aquisição 0,6329 cm⁻¹/s; Scans 32; e Scans Background: 32.

As amostras foram reposicionadas a cada aquisição de espectro e o background foi realizado antes de cada medida. Foram realizados 4 tipos de análise no espectro:

3.6.1 Ajuste de sub-bandas de amida I (AI)

A banda de amida I está principalmente relacionada às vibrações de estiramento dos grupos carbonila (ligações C=O) presentes ao longo das cadeias polipeptídicas (Changa & Tanaka, 2002). Para calcular AI realizou-se a divisão entre os picos das ligações cruzadas enzimáticas maduras de piridinolina (PYR - 1660cm⁻¹) e o pico das ligações cruzadas enzimáticas

imaturas de dihidroxinorleucina (DHLNL – 1690cm⁻¹). Assim, quanto maior o valor de AI, maior será a quantidade de ligações cruzadas enzimáticas maduras na amostra (Barth et al., 2011).

3.6.2 Análise de Cristalinidade – Índice de Cristalinidade (IC)

Para calcular IC deve-se realizar a divisão entre os picos 551 e 597cm⁻¹ por 588cm⁻¹. Quanto maiores os valores de IC, maior será a ordem, organização e tensão dos cristais de hidroxiapatita.

3.6.3 Razão das áreas das bandas Amida I + II / fosfato (M:MI)

A banda de amida II está relacionada principalmente a vibrações de flexão entre N–H e vibrações de estiramento entre C–N presente nas ligações peptídicas (Changa & Tanaka, 2002).

A razão da área integrada da banda de amida I + amida II (1520-1720cm⁻¹) pela área integrada da banda de fosfato (916-1180cm⁻¹) corresponde à interação e proporção entre material orgânico e inorgânico. Além disso, a intensidade das bandas 1521, 1539, 1559 e 1576 cm⁻¹ aumenta quando ocorre redução dos níveis de ligações cruzadas, com consequente alteração estrutural.

3.6.4 Razão das áreas das bandas Amida III + colágeno / fosfato (M:MIII)

A banda de amida III é complexa e surge principalmente a partir de vibrações de estiramento entre C–N e vibrações de deformação entre N–H. Tem sido utilizada para estimativa das ligações covalentes entre nano cristais de hidroxiapatita e moléculas de colágeno (Changa & Tanaka, 2002).

A razão da área integrada da banda de amida III (1210-1270cm⁻¹) + duas bandas de colágeno (1269-1296cm⁻¹; 1180-1213cm⁻¹) pela área integrada da banda de fosfato (916-1180cm⁻¹) corresponde à interação e proporção entre material orgânico e inorgânico.

Os dados provenientes das quatro análises do espectro ósseo foram registrados e analisados por meio do programa OPUS 6.5 (Bruker, Ettlingen, Germany) (Figura 6). Em seguida os testes estatísticos foram estabelecidos de acordo com a normalidade dos dados.

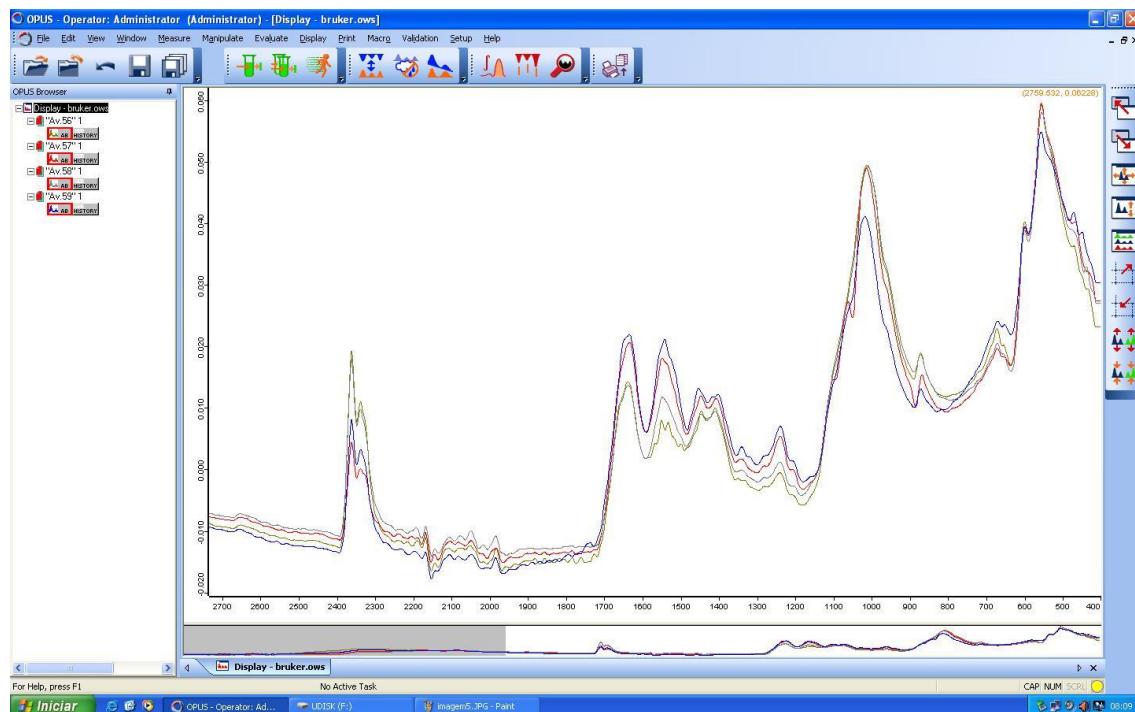


Figura 6: Espectro ósseo obtido do FTIR, utilizando o programa OPUS 6.5.

3.7 Análise estatística

Os resultados foram submetidos ao teste de normalidade e homogeneidade. Em seguida foi aplicado o teste ANOVA TWO-WAY seguido do teste de Tukey, sendo a diferença estatística considerada quando $\alpha < 0,05$. As análises foram realizadas com o programa estatístico Sigma Plot versão 13.1 (Systat Software Inc, San Jose, CA, EUA).

4 RESULTADOS

4.1 Estabelecimento do DM

Os animais considerados diabéticos (GD e DH) apresentaram hiperglicemia com índices glicêmicos superiores a 200mg/dl, redução de peso nas primeiras semanas, polifagia, polidipsia e poliúria, constatadas a partir do aumento no consumo de ração, água e excreção urinária, respectivamente.

4.2 Teste Mecânico

Na análise mecânica, os animais diabéticos (GD e DH) apresentaram redução nos valores de força máxima, rigidez e energia em comparação com os animais saudáveis (GC e CH) ($p <0,007$). No entanto, houve aumento na força máxima e rigidez quando utilizada a terapia com OH (CH e DH), em comparação com os animais sem tratamento (GC e GD) ($P <0,042$) (Tabela 1).

Tabela 1: Valores de média e desvio padrão do teste mecânico.

Testes/Grupos	GC	CH	GD	DH
Força máxima	117 ± 11.37 Ab	124 ± 11.63 Aa	100 ± 5.66 Bb	107 ± 8.86 Ba
Energia	38.8 ± 8.2 Aa	38.3 ± 8.37 Aa	30.6 ± 3.67 Ba	33 ± 8.69 Ba
Rigidez	366 ± 37.65 Ab	377 ± 26.02 Aa	233 ± 33.1 Bb	277 ± 43.03 Ba

Grupos: GC – Controle, CH – Controle + OH, GD – Diabetes, DH – Diabetes + OH. Letra maiúscula: condição (saudável ou diabético); Letra minúscula: tratamento com ou sem OH. Valores com letras diferentes representam

diferenças estatisticamente significantes para cada parâmetro analisado ($P<0,05$).

4.3 Espectroscopia no infravermelho transformada de Fourier - FTIR

Na análise com FTIR foi possível identificar espectros característicos de tecido ósseo (Figura 7), com as principais bandas de absorção presentes no espectro infravermelho do osso: componentes de colágeno (Amida I, II e III), fosfato (PO_4^{3-}), carbonato (CO_3^{2-}), hidroxila (OH-) e água (H_2O).

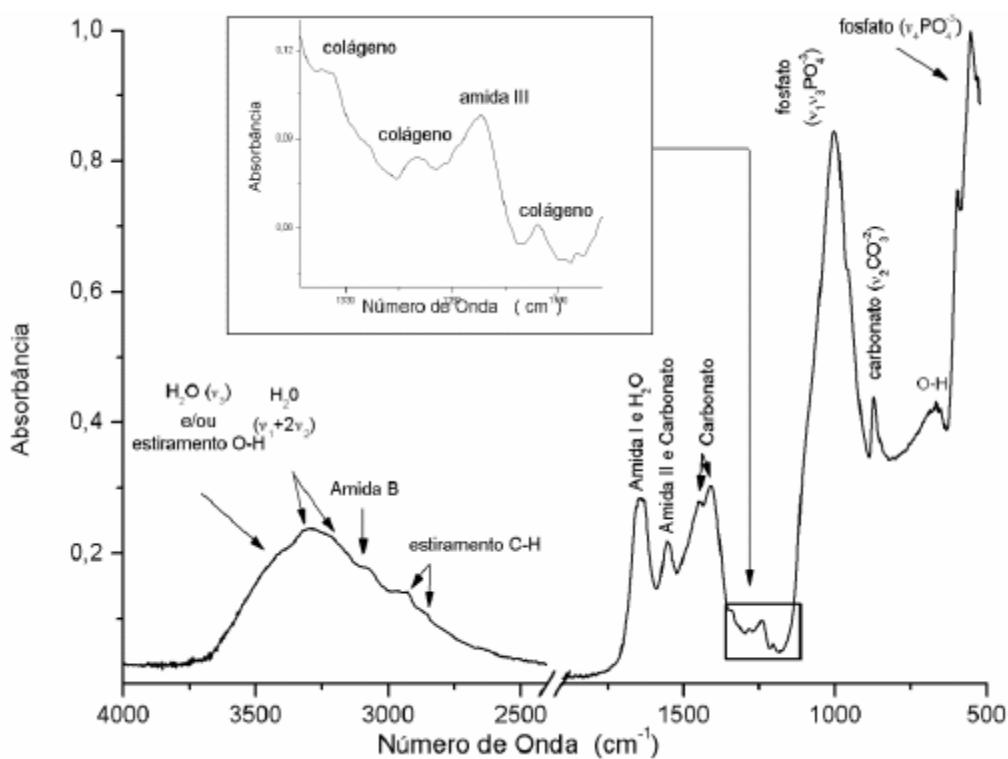


Figura 7: Espectro de absorção na região do infravermelho do tecido ósseo.

Na análise de espectro do ajuste de sub-banda de amida I (AI), a análise estatística mostrou que houve diminuição da piridinolina (PYR) nos animais diabéticos sem tratamento (GD) comparando-os aos outros animais (GC, CH e DH) ($P = 0,003$). Os valores do índice de cristalinidade (IC) reduziram nos animais diabéticos (GD e DH), em comparação com os animais saudáveis (GC e CH) ($P = 0,034$). A relação entre matriz orgânica e inorgânica em M:MI não apresentou diferença estatística significante entre os animais saudáveis e diabéticos (GC, CH, GD e DH) ($P > 0,278$). Porém, em M:MIII houve aumento na proporção entre matriz orgânica e mineral nos animais diabéticos tratados (DH) quando comparado com os animais saudáveis e diabéticos sem tratamento (GC e GD) ($P = 0,035$) (Tabela 2).

Tabela 2: Valores de média e desvio padrão da análise por FTIR-ATR.

Testes/Grupos	GC	CH	GD	DH
AI	4.23 ± 0.88	3.83 ± 1.37	1.72 ± 1.12	3.83 ± 1.58
	Aa	Aa	Bb	Aa
IC	3.01 ± 0.3	3.02 ± 0.38	2.48 ± 0.38	2.9 ± 0.33
	Aa	Aa	Ba	Ba
M:MI	0.62 ± 0.38	0.6 ± 0.4	0.51 ± 0.28	0.82 ± 0.37
	Aa	Aa	Aa	Aa
M:MIII	0.02 ± 0.02	0.04 ± 0.04	0.03 ± 0.01	0.06 ± 0.04
	Ab	Aa	Ab	Aa

Grupos: GC – Controle, CH – Controle + OH, GD – Diabetes, DH – Diabetes + OH. Letra maiúscula: condição (saudável ou diabético); Letra minúscula: tratamento com ou sem OH. Valores com letras diferentes representam diferenças estatisticamente significantes para cada parâmetro analisado ($p<0,05$).

5 DISCUSSÃO

DM constitui uma epidemia moderna que afeta 382 milhões de pessoas em todo o mundo (Dede et al., 2014). Além disso, é uma doença heterogênea multiorgânica que afeta profundamente vários sistemas do corpo humano. Ela pode levar a alterações na angiogênese, redução no tempo de cicatrização, diminuição da expressão do fator de crescimento e alterar a microarquitetura óssea (Kanter et al., 2007).

No presente estudo, foi utilizado o protocolo para estabelecer DM tipo 1 a partir da administração de STZ, a qual é eficaz na destruição das células β pancreáticas e causa consequente deficiência na secreção de insulina. Este método de indução é amplamente utilizado, tornando-o útil no momento de comparação dos resultados entre estudos com o mesmo modelo de indução. Baixas doses de STZ tem gerado um fenótipo ósseo consistente quando comparado aos estudos em humanos e modelos espontâneos, confirmando a utilidade deste método (Szkudelski, 2001; Motyl & McCabe, 2009).

A oxigenação hiperbárica (OH) é uma terapia relativamente nova e ainda não possui protocolos específicos relacionados à quantidade de sessões e ao intervalo entre estas sessões. O tipo de injúria e a severidade da mesma parecem ser essenciais no estabelecimento de protocolos ideais. Embora ainda não exista um número exato de sessões, tem sido observado que o tratamento tende a ser prolongado em lesões crônicas, sendo que a indicação para o tratamento de úlceras em pacientes diabéticos é de pelo menos dez sessões

de OH (Matos & Nunez, 1999; Weaver, 1999). D'Agostino Dias et al. (2008) avaliaram 1506 indivíduos submetidos à OH e concluíram que foram necessárias em média 15 sessões de OH para tratamento de injúrias agudas, enquanto que para lesões crônicas foram necessárias 30 sessões. No presente estudo foram realizadas 15 sessões de OH a cada 48 horas com o objetivo de avaliar o efeito desta terapia nas propriedades biomecânicas e estruturais dos ossos de ratos diabéticos.

A DM está associada a maior risco à fratura óssea. A redução na Densidade Mineral Óssea (DMO) e maior fragilidade óssea em alguns pacientes diabéticos, tem sido relacionada à redução nos níveis de vitamina D associada à hiperglicemia e aumento na excreção de cálcio na urina. Entretanto, estudos têm demonstrado que pacientes diabéticos podem apresentar níveis normais ou maiores de DMO e, ao mesmo tempo maior tendência às fraturas. Este fato indica que as fraturas ósseas em indivíduos com DM não estariam relacionadas apenas com o conteúdo mineral, mas também ao componente orgânico (Vestergaard et al., 2007). Assim, compreender melhor as propriedades do osso do diabético poderiam explicar o risco aumentado à fratura, embora a relação entre as propriedades biomecânicas e a proporção entre matriz colágena e mineral ainda não seja claramente entendida.

As propriedades mecânicas são utilizadas para compreensão do comportamento mecânico de um material, que reflete a relação entre resposta ou deformação à carga aplicada (Rho et al., 1998). O osso é um órgão altamente complexo, apresentando uma estrutura hierárquica altamente organizada de seus constituintes minerais e orgânicos. Em condições fisiológicas, o osso apresenta componentes intrínsecos e extrínsecos de proteção que podem suportar cargas variadas e em direções distintas (Ritchie, 1999; Felsenberg & Boonen, 2005).

Ensaios mecânicos são importantes ferramentas que facilitam o conhecimento das propriedades mecânicas dos ossos. Para aferimento real das propriedades mecânicas o ensaio mecânico deve simular principalmente a

maior força solicitada quando em atividades normais. No fêmur, por exemplo, os principais esforços atuantes são os de compressão e de flexão. Neste estudo, utilizou-se o ensaio de flexão a três pontos devido ao fato deste método fornecer parâmetros fundamentais das propriedades mecânicas dos ossos, como a rigidez e energia (Jepsen et al., 2015).

Rigidez óssea caracteriza a resistência à deformação do osso quando tensionado. A força máxima à fratura equivale à maior carga que a estrutura do osso pode suportar antes de fraturar. A energia mede a quantidade de energia absorvida pelo osso enquanto ele se deforma elasticamente, sem deformar-se permanentemente (Jepsen et al., 2015).

No presente estudo, o DM diminuiu a força máxima à fratura, rigidez e energia, fato que demonstra que a DM altera as propriedades mecânicas do osso. A resistência óssea depende diretamente dos elementos estruturais dos ossos, que são organizados de forma hierárquica desde o menor ao maior nível da escala de comprimento (Felsenberg & Boonen, 2005). Em nível ultraestrutural da escala, a estrutura óssea contém basicamente colágeno tipo I, proteoglicanos, proteínas não colagenosas, além de cálcio e fosfato na forma de hidroxiapatita (Dempster, 2006). Assim, conhecer a quantidade e qualidade dessas estruturas presentes no osso torna-se muito útil a fim de se compreender melhor a resistência óssea.

No presente estudo, para avaliação dos componentes estruturais da matriz óssea utilizou-se a espectroscopia FTIR por ATR. Nesta técnica o procedimento de preparação da amostra é reduzido, pois as amostras são colocadas em contato direto com um cristal com ATR antes das medições dos espectros (Kazarian & Chan, 2006; Aksoy et al., 2014), não necessitando de um agente de contraste (Kazarian & Chan, 2006). Assim, esta ferramenta tem sido muito empregada para análise de alterações químicas dos componentes da matriz óssea, possibilitando investigar o grau de desordem estrutural da hidroxiapatita e do colágeno (Boskey et al., 2005; Barth et al., 2011).

A razão das áreas dos picos entre 1660:1690cm⁻¹ diminuíram nos animais diabéticos (GD e DH) comparado aos sadios (GC e CH), os quais apresentaram maiores quantidades de ligações cruzadas (PYR) na região da amida I. Por outro lado, a redução neste índice com a presença de DM sugere uma maior proporção de ligações cruzadas imaturas (DHLNL) em relação às maduras (PYR) (Barch et al., 2011; Fredericks et al., 2012).

A razão entre as ligações cruzadas indica o estado de maturação das ligações cruzadas na fibrila colágena (Paschalis et al., 2003), às quais são importantes para as propriedades mecânicas e estruturais do osso (Gourion-Arsiquaud et al., 2009). Portanto, as ligações imaturas DHLNL assim como sua forma madura PYR representam os tipos de ligações cruzadas enzimáticas mais encontrados nos ossos (Saito & Marumo, 2015).

Além disso, sabe-se que caso ocorra redução de ligações DHLNL (ligações enzimáticas intrafibrilares) ou de PYR (ligações enzimáticas interfibrilares) pode ocorrer alterações na integridade estrutural óssea, com aumento da friabilidade das fibrilas e redução da energia absorvida necessária para fraturar (Barch et al., 2011), fato ocorrido no presente trabalho. Gourion-Arsiquaud et al (2009) mostraram que ligações cruzadas intermoleculares no colágeno foram importantes para o desenvolvimento de matrizes subjacentes que serviriam de base à mineralização inicial e crescimento dos cristais de hidroxiapatita.

O IC é definido como a fração do volume de cristalinidade em uma determinada amostra e representa a média em tamanho, perfeição e ordenamento dos cristais (Reyes-Gasga et al., 2013). Dessa forma, a partir dos resultados provenientes de AI e IC, onde houve redução nos diabéticos (DH e GD) comparando-os com os normoglicêmicos (GC e CH), pode-se sugerir que o DM alterou negativamente os mecanismos de deposição mineral. Boyar et al (2004) também relataram que o DM altera o tamanho dos cristais da matriz óssea em ratos diabéticos.

Danos na interface colágeno/cristais podem ocorrer a partir da descarboxilação das cadeias laterais de colágeno, reduzindo o número de ligações mediadas por íons entre as duas fases (Hubner et al., 2005), resultando em uma interface enfraquecida, com menor capacidade de transferir cargas do colágeno aos cristais, promovendo deformação maior quando tensionado (Deymier-Black et al., 2013). Entretanto, no presente estudo não ocorreram diferenças estatisticamente significantes entre os grupos na análise da proporção entre mineral e colágeno por M:MI, sendo que Bi et al. (2005) relataram que as bandas amida I e amida II poderiam ser utilizadas para determinar a orientação das fibras colágenas.

Por outro lado, os animais com OH (CH e DH) apresentaram aumento na interação entre colágeno e os cristais quando comparados com os animais sem OH (GC e GD) em M:MIII. Estes resultados sugerem que a oxigenação hiperbárica aumentou as interações intermoleculares por meio de pontes de hidrogênio no colágeno, alterando a estrutura molecular, mas sem modificar a orientação das fibras (Chang & Tanaka, 2002).

Além disso, o atual estudo mostrou que a OH aumentou ligações cruzadas maduras (PYR) em ratos diabéticos em relação aos diabéticos sem OH (GD). Saito & Marumo (2015) relataram que a PYR induz o padrão das ligações cruzadas, influenciam na mineralização da matriz óssea, aumentam força necessária à fratura e rigidez, assim como ocorreu no presente estudo. Porém, os mecanismos que regem as influências da OH nas ligações cruzadas do diabético ainda são desconhecidos (Thom et al., 2011).

Alguns estudos experimentais em ratos documentaram os efeitos biomecânicos em ossos de ratos induzidos com STZ (Facchini et al., 2006; Zhang et al., 2007; Silva et al., 2009). Entretanto, os estudos apresentam diferenças em suas metodologias, especialmente no tempo de duração do DM, nas diferentes espécies de animais utilizadas e nas drogas de indução de DM (Korres et al., 2013). Apesar das diferenças metodológicas, estes estudos demonstraram consistentes reduções na força máxima à fratura nos grupos

diabéticos, assim como foi encontrado nos resultados do presente trabalho (Korres et al., 2013; Barth et al., 2011).

6 CONCLUSÃO

Os resultados sugerem que o DM altera a arquitetura estrutural da hidroxiapatita e do colágeno, caracterizada pela redução na capacidade em absorver energia, na força máxima à fratura e na rigidez, bem como aumento do risco de fratura. Além disso, a OH mostrou ser um importante tratamento ao melhorar propriedades no osso de ratos diabéticos.

REFERÊNCIAS*

- Aguirre F, Brown A, Cho NH, Dahlquist G, Dodd S, Dunning T, et al. International Diabetic Federation, **Diabetes Atlas**. 2013.
- Aksoy C, Kaya FA, Kuşkonmaz BB, Uçkan D, Severcan F. Structural investigation of donor age effect on human bone marrow mesenchymal stem cells: FTIR spectroscopy and imaging. **Age**. 2014;36(4):9691.
- Al Hadi H, Smerdon GR, Fox SW. Hyperbaric oxygen therapy accelerates osteoblast differentiation and promotes bone formation. **J Dent**. 2015; Mar;43(3):382-8.
- American Diabetes Association (ADA). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**. v. 27, p. S5-S10, 2004.
- Bailey AJ. **Molecular mechanisms of ageing in connective tissues**. Mech. Ageing Dev. 2001; 122, 735.
- Barth HD, Zimmermann EA, Schaible E, Tang SY, Alliston T, Ritchie RO. Characterization of the effects of x-ray irradiation on the hierarchical structure and mechanical properties of human cortical bone. **Biomaterials**. 2011; 32 , 88-92 .
- Beckmann KH, Meyer-Hamme G, Schröder S. Low level laser therapy for the treatment of diabetic foot ulcers: a critical survey. **Evid Based Complement Alternat Med**. 2014; 2014:626127.
- Bi X, Li G, Doty SB, Camacho NP. A novel method for determination of collagen orientation in cartilage by Fourier transform infrared imaging spectroscopy (FT-IRIS). **Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society**. 2005;13(12):1050-8.
- Bishop AJ & Mudge, E. A retrospective study of diabetic foot ulcers treated with hyperbaric oxygen therapy. **Int Wound J**. 2012 Dec;9(6):665-76.
- Boskey AL, DiCarlo E, Paschalis E, West P, Mendelsohn R. Comparison of mineral quality and quantity in iliac crest biopsies from high- and low-turnover

osteoporosis: an FT-IR microspectroscopic investigation. **Osteoporos. Int.** 2005; vol. 16, no. 12, pp. 2031-8.

Boyar H, Zorlu F, Mut M, Severcan F. The effects of chronic hypoperfusion on rat cranial bone mineral and organic matrix. A Fourier transform infrared spectroscopy study. **Analytical and bioanalytical chemistry.** 2004;379(3):433-8.

Changa, M C & Tanaka, J. FT-IR study for hydroxyapatite/collagen nanocomposite cross-linked by glutaraldehyde. **Biomaterials**, 23 (2002) 4811–4818.

Currey JD. **Bones: Structure and Mechanics.** Princeton University Press, Princeton, New Jersey 2006.

D'Agostino Dias M, Fontes B, Poggetti RS, Birolini D. Hyperbaric oxygen therapy: Types of injury and number of sessions – a review of 1506 cases. **Undersea Hyperb Med.** 2008; 35(1):53-60.

Dechichi P, Biffi JC, Moura CC, de Ameida AW. A model of the early mineralization process of mantle dentin. **Micron.** 2007; 38 (5):486-91.

Dede AD, Tournis S, Dontas I, Trovas G. Type 2 diabetes mellitus and fracture risk. **Metabolism: clinical and experimental.** 2014;63(12):1480-90.

Delfino VDA, Figueiredo JF, Matsuo T, Favero ME, Matni AM, Mocelin A. Diabetes mellitus induzido por estreptozotocina: comparação em longo prazo entre duas vias de administração. **J Bras Nefrol.** 2002; 24(1):31-6.

Dempster DW. Anatomy and functions of the adult skeleton. In: Favus MJ, et al. **Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism**, 6th ed. Washington, DC: American Society for Bone and Mineral Research; 2006. p. 7–11.

Deymier-Black AC, Singhal A, Almer JD, Dunand DC. Effect of X-ray irradiation on the elastic strain evolution in the mineral phase of bovine bone under creep and load-free conditions. **Acta biomaterialia.** 2013;9(2):5305-12.

Dooley C, Tisbo P, Lee TC, Taylor D. Rupture of osteocyte processes across microcracks: the effect of crack length and stress. **Biomech. Model Mechanobiol.** 2012; 11 , 759.

Facchini DM, Yuen VG, Battell ML, McNeill JH, Grynpas MD. The effects of vanadium treatment on bone in diabetic and non-diabetic rats. **Bone.** 2006;38(3):368-77.

Felsenberg D & Boonen S. The bone quality framework: Determinants of bone strength and their interrelationships, and implications for osteoporosis management. **Clin Ther.** 2005; 27(1):1–11.

Fredericks JD, Bennett P, Williams A, Rogers KD. FTIR spectroscopy: A new diagnostic tool to aid DNA analysis from heated bone. **Forensic science international Genetics.** 2012; 6(3):375-80.

Gourion-Arsiquaud S, Burkett JC, Havill LM, et al. Spatial variation in osteonal bone properties relative to tissue and animal age. **Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research.** 2009 ;24(7):1271-81.

Gurdol F, Cimsit M, Oner-lyidogan Y, Kocak H, Sengun S, Yalcinkaya-Demirsoz, S. Collagen synthesis, nitric oxide and asymmetric dimethylarginine in diabetic subjects undergoing hyperbaric oxygen therapy. **Physiol Res.** 2010; 59(3):423-9.

Hubner W, Blume A, Pushnjakova R, Dekhtyar Y, Hein HJ. The influence of X-ray radiation on the mineral/organic matrix interaction of bone tissue: an FT-IR microscopic investigation. **The International journal of artificial organs.** 2005;28(1):66-73.

Jan A, Sándor GK, Brkovic B, Peel S, Evans AW, Clokie, CM. Effect of hyperbaric oxygen on grafted and nongrafted calvarial critical-sized defects. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology.** 2009; v. 107, n. 2, p. 157-163.

Janghorbani M, Dam RMV, Willet W, Hu FB. Systematic review of type 1 and type 2 diabetes mellitus and risk of fracture. **Am J Epidemiol.** 2007; 166:495–505.

Jepsen KJ, Silva MJ, Vashishth D, Guo XE, van der Meulen MC. Establishing biomechanical mechanisms in mouse models: practical guidelines for systematically evaluating phenotypic changes in the diaphyses of long bones. **J Bone Miner Res.** 2015 Jun;30(6):951-66.

Kanter M, Altan MF, Donmez S, Ocakci A, Kartal ME. The effects of quercetin on bone minerals, biomechanical behavior, and structure in streptozotocin-induced diabetic rats. **Cell biochemistry and function.** 2007;25(6):747-52.

Kawada S, Wada E, Matsuda R, Ishii N. Hyperbaric Hyperoxia Accelerates Fracture Healing in Mice. **PLoS One.** 2013; 8(8): e72603.

Kazarian SG. & Chan KLA. Applications of ATR-FTIR spectroscopic imaging to biomedical samples. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes.** Volume 1758, Issue 7, July 2006, Pages 858–867.

Korres N, Tsiridis E, Pavlou G, Mitsoudis A, Perrea DN, Zoumbos AB. Biomechanical characteristics of bone in streptozotocin-induced diabetic rats: An in-vivo randomized controlled experimental study. **World journal of orthopedics.** 2013;4(3):124-9.

Leon BM & Maddox TM. Diabetes and cardiovascular disease: Epidemiology, biological mechanisms, treatment recommendations and future research. **World J Diabetes.** 2015; October 10; 6(13): 1246-1258.

Löndahl M. Hyperbaric Oxygen Therapy as Adjunctive Treatment of Diabetic Foot Ulcers. **Med Clin N Am.** 2013; 97. 957–980.

Motyl K & McCabe LR. Streptozotocin, type I diabetes severity and bone. **Biol Proced Online.** 2009; 11:296–315.

Nair AK, Gautieri A, Chang S-W, Buehler MJ. Molecular mechanics of mineralized collagen fibrils in bone. **Nat. Commun.** 2013 , 4 , 1724.

Nalla RK, Kinney JH, Ritchie RO. Mechanistic fracture criteria for the failure of human cortical bone. **Nat. Mater.** 2003; 2, 164.

Paschalis EP, Recker R, DiCarlo E, Doty SB, Atti E, Boskey AL. Distribution of collagen cross-links in normal human trabecular bone. **Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research.** 2003; 18(11):1942-6.

Reddy G, Stehno-Bittel L, Hamade S, Enwemeka C. The biomechanical integrity of bone in experimental diabetes. **Diabetes Research and Clinical Practice.** 2001; v. 54, n. 1, p. 1-8.

Reyes-Gasga J, Martinez-Pineiro EL, Rodriguez-Alvarez G, Tiznado-Orozco GE, Garcia-Garcia R, Bres EF. XRD and FTIR crystallinity indices in sound human tooth enamel and synthetic hydroxyapatite. **Materials science & engineering C, Materials for biological applications.** 2013;33(8):4568-74.

Rho J-Y, Kuhn-Spearing L, Ziopoulos P. Mechanical properties and the hierarchical structure of bone. **Medical Engineering & Physics.** 1998; 20. 92–102.

Riella MC. **Princípios de Nefrologia e Distúrbios Hidroeletrolíticos.** Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro: 4^a edição, 2002.

Ritchie RO. Mechanisms of fatigue-crack propagation in ductile and brittle solids. **Int. J. Fract.** 1999 , 100 , 55 .

Saito M & Marumo K. Effects of Collagen Crosslinking on Bone Material Properties in Health and Disease. **Calcified tissue international.** 2015;97(3):242-61.

Saito M, Mori S, Mashiba T, Komatsubara S, Marumo K. Collagen maturity, glycation induced-pentosidine, and mineralization are increased following 3-year treatment with incadronate in dogs. **Osteoporos. Int.** 2008; 19, 1343–1354.

Sala, O. **Fundamentos da espectroscopia Raman e no infravermelho**, 2 ed. São Paulo: Unesp, 2008, pp. 10 – 34.

Saller A, Maggi S, Romanato G, Tonin P, Crepaldi G. Diabetes and osteoporosis. **Aging Clinical and Experimental Research**. 2008; v. 20, n. 4, p. 280-289.

Sammarco MC, Simkin J, Cammack AJ, Fassler D, Gossman A, Marrero L, et al. Hyperbaric Oxygen Promotes Proximal Bone Regeneration and Organized Collagen Composition during Digit Regeneration. **PLoS One**. 2015; Oct 9;10(10):e0140156.

Saraiya N & Martin ST. New Options in Insulin Therapy. **Conn Med**. 2015 Oct; 79(9):553-60.

Seeman E & Delmas PD. Bone quality – the material and structural basis of bone strength and fragility. **N. Engl. J. Med.** 2006; 354, 2250–2261.

Siegmund T, Allen MR, Burr DB. Failure of mineralized collagen fibrils: modeling the role of collagen cross-linking. **J. Biomech.** 2008; 41 , 1427 .

Silva MJ, Brodt MD, Lynch MA, et al. Type 1 diabetes in young rats leads to progressive trabecular bone loss, cessation of cortical bone growth, and diminished whole bone strength and fatigue life. **Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research**. 2009;24(9):1618-27.

Silver FH, Christiansen DL, Snowhill PB, Chen Y. Role of storage on changes in the mechanical properties of tendon and self-assembled collagen fibers. **Connect. Tissue Res.** 2000; 41 , 155.

Szkudelski T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. **Physiol Res.** 2001; 50(6):537–546.

Thom SR, Milovanova TN, Yang M, et al. Vasculogenic stem cell mobilization and wound recruitment in diabetic patients: increased cell number and intracellular regulatory protein content associated with hyperbaric oxygen

therapy. **Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society.** 2011;19(2):149-61.

van Lenthe GH, Mueller TL, Wirth AJ, Müller R. Quantification of bone structural parameters and mechanical competence at the distal radius. **J Orthop Trauma.** 2008; Sep;22(8 Suppl):S66-72.

Vestergaard P, Rejnmark L, Mosekilde L. Relative fracture risk in patients with diabetes mellitus, and the impact of insulin and oral antidiabetic medication on relative fracture risk. **Diabetologia.** 2005; v. 48, n. 7, p. 1292-1299.

Vestergaard P. Discrepancies in bone mineral density and fracture risk in patients with type 1 and type 2 diabetes-a meta-analysis. **Osteoporos Int.** 2007; 18:427-44.

Weaver L. Management of critically ill patients in the monoplace hyperbaric chamber. In: Kindwall EP, Whelan HT, eds. **Hyperbaric Medicine Practice.** USA: Best Publishing Company 1999:245-322.

Wei J & Ducy P. Co-dependence of bone and energy metabolisms. **Archives of biochemistry and biophysics.** 2010; 503(1):35-40.

Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. **Diabetes Care.** 2004; v. 27, n. 5, p. 1047-1053.

Zhang SQ, Chen GH, Lu WL, Zhang Q. Effects on the bones of vanadyl acetylacetone by oral administration: a comparison study in diabetic rats. **Journal of bone and mineral metabolism.** 2007;25(5):293-301.

Zimmermann EA, Gludovatz B, Schaible E, Dave NKN, Yang W, Meyers MA, Ritchie RO. Mechanical adaptability of the Bouligand-type structure in natural dermal armour. **Nat. Commun.** 2013; 4 - 2634.

ANEXOS



Universidade Federal de Uberlândia
– Comissão de Ética na Utilização de Animais –



CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo para uso de animais em experimentação nº 026/14, sobre o projeto de pesquisa intitulado “Efeito da oxigenação hiperbárica e do laser de baixa potência no reparo e biomecânica em osso de ratos diabéticos”, sob a responsabilidade da Profª. Drª. Paula Dechichi está de acordo com os princípios éticos na experimentação animal conforme regulamentações do Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA) e foi **APROVADO** pela Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA) – UFU em reunião de **29 de Agosto de 2014**.

(We certify that the protocol nº 026/14, about “Efeito da oxigenação hiperbárica e do laser de baixa potência no reparo e biomecânica em osso de ratos diabéticos”, agrees with the ETHICAL PRINCIPLES ON ANIMAL RESEARCH as regulations of National Advice of Control and Animal Experimentation (CONCEA) and approved by Ethics Commission on Use of Animals (CEUA) – Federal University of Uberlândia in 29/08/2014).

Uberlândia, 29 de Agosto de 2014.

Prof. Dr. César Augusto Garcia
Coordenador da CEUA/UFU